



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : A61L 25/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/19519 (43) Date de publication internationale: 26 décembre 1991 (26.12.91)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00475</p> <p>(22) Date de dépôt international: 13 juin 1991 (13.06.91)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 90/07505 15 juin 1990 (15.06.90) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): FONDATION NATIONALE DE TRANSFUSION SANGUINE [FR/FR]; 6, rue Alexandre-Cabanel, F-75739 Paris Cédex 15 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CHABBAT, Jacques [FR/FR]; 42, rue Nollet, F-75017 Paris (FR). COURTEILLE, Frédéric [FR/FR]; 9, rue du Docteur-Henouille, F-94230 Cachan (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: FLUID BIOLOGICAL GLUE</p> <p>(54) Titre: COLLE BIOLOGIQUE FLUIDE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A two-part biological glue for human or animal tissue comprising a fibrinogen-based first component and a thrombin-based second component which are extemporaneously mixed when needed. The fibrinogen-based component contains at least one chaotropic agent.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention se rapporte à une colle biologique pour tissus humains ou animaux du type à deux composants comportant: un premier composant à base de fibrinogène, et un second composant à base de thrombine destinés à être mélangés extemporanément au moment de l'emploi, caractérisée en ce que le composant à base de fibrinogène contient au moins un agent chaïotropique.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mal
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	CN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	BU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

COLLE BIOLOGIQUE FLUIDE

La présente invention concerne une colle biologique pour tissus humains ou animaux, stabilisée sous une forme fluide à basse température.

Le type de colle utilisée pour réunir des tissus humains ou animaux est en général un concentré de facteurs de l'hémostase, coagulable par la thrombine, et riche en fibrinogène.

Ces colles sont en fait composées de deux constituants essentiels, destinés à être mélangés extemporanément lors de leur application. Le premier composant contient essentiellement du fibrinogène. Il est le plus souvent constitué d'un mélange de protéines extraites du plasma humain et contient, en plus du fibrinogène, de la fibronectine et du facteur XIII. Quant au second composant, il contient essentiellement de la thrombine calcique, qui peut être d'origine humaine ou animale, bovine par exemple. Ce type de colle est notamment décrit dans les brevets EP 103 196, EP 253 198, EP 37 078 et EP 183 674.

Très récemment, la Demandante a proposé une nouvelle colle présentant l'avantage d'être sous une forme pasteurisée, (FR 89 10355, déposé le 1.8.89 au nom de la Fondation Nationale de Transfusion Sanguine). Cette colle pasteurisée permet ainsi de s'affranchir de tout risque de contamination virale, pouvant provenir du fibrinogène extrait du plasma humain.

L'un des inconvénients de ces colles biologiques est leur instabilité au stockage. En effet, si l'on conserve la colle à la température de 4°C, la thrombine demeure stable mais le fibrinogène tend à polymériser; par contre, à une température de l'ordre de 20 à 25°C, c'est la thrombine qui se détériore. C'est pourquoi, l'une des techniques utilisées pour conserver ces colles consiste à les congeler. Evidemment, lors de l'utilisation de ces colles, il est alors nécessaire de les décongeler, ce qui est mal commode, et en outre prend du temps, car il n'est pas possible de les chauffer brutalement au risque d'en dégrader les composants.

5 Faute d'utiliser ce type de colle, il est alors nécessaire d'employer des colles préparées depuis peu de temps. Il est évident que la préparation de telles colles pour ainsi dire au jour le jour rend la gestion industrielle de ce type de produit très difficile.

10 Il était donc intéressant de mettre au point une colle utile à la consommation, sous forme liquide, qui soit ainsi directement prête à l'emploi.

15 C'est précisément l'objet de la présente invention de proposer une colle utile à la consommation sous forme fluide, qui puisse être stockée à basse température, c'est-à-dire entre -2 et -10°C, de préférence, comme cela est habituel pour les produits de ce type, au voisinage de 4°C, la température des réfrigérateurs.

20 Pour ce faire, la présente invention se rapporte à une colle biologique pour tissus humains ou animaux du type à deux composants, comportant :

25 - un premier composant à base de fibrinogène, et
- un second composant à base de thrombine,
destinés à être mélangés extemporanément au moment de l'emploi, caractérisée en ce que le composant à base de fibrinogène contient au moins un agent chaotropique, et en ce que la colle est liquide à basse température.

30 En effet, il a été mis en évidence que l'adjonction d'un agent chaotropique, et en particulier l'urée, permettait de prévenir la polymérisation du fibrinogène à basse température. Il devient alors possible de conserver les deux composants de la colle biologique, sous une forme fluide, à une même température. Ceci présente un net avantage tant pour le stockage que sur le plan commodité pour les utilisateurs, qui disposent immédiatement d'une colle sous forme fluide.

35 L'invention peut être mise en oeuvre avec une colle biologique quelconque du type à deux composants. Elle est plus particulièrement intéressante avec la colle objet du brevet FR 89 10355 précédemment identifié.

Le composant à base de fibrinogène, utilisé dans ce type de colle, provient la plupart du temps d'un mélange de protéines extraites de plasma humain, comme cela a été mentionné précédemment. Il est donc nécessaire de lui faire subir une inactivation virale. Cette inactivation peut ainsi être réalisée par pasteurisation dudit composant.

Quant au composant à base de thrombine, il s'agit surtout de thrombine calcique.

Ces deux composants sont stockés, soit séparément dans des flaconnages différents, soit dans des dispositifs applicateurs qui assurent leur mélange lors de l'application, notamment des dispositifs à deux seringues jumelées.

Quel que soit le type de colle ou de dispositif, la présente invention présente un intérêt considérable.

L'agent chaïotropique est utilisé à des concentrations comprises de préférence entre 0,3 et 1 M, notamment à une concentration proche de 0,5 M.

Il faut en outre tenir compte du fait que l'ajout de cet agent chaïotropique est limité pour des raisons d'osmolarité, laquelle doit demeurer compatible avec le milieu où la colle doit être appliquée.

C'est pourquoi, selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ce composant à base de fibrinogène subit une étape de réduction de son osmolarité, notamment avant l'ajout de l'urée. L'osmolarité du composant à base de fibrinogène est initialement comprise habituellement entre 700 et 800 mosmol. Il est clair que l'ajout d'urée à celui-ci implique une augmentation de celle-ci. Une valeur trop importante de cette osmolarité pouvant entraîner un risque de toxicité cellulaire, il est par conséquent prudent de réduire l'osmolarité initiale, de manière à ce qu'elle demeure compatible avec les conditions physiologiques en présence d'urée.

Cette réduction de l'osmolarité peut être ainsi réalisée en effectuant une dialyse par ultrafiltration du composant à base de fibrinogène, ou par tout autre moyen.

Enfin, il est possible d'améliorer la qualité d'adhésivité de la colle biologique selon l'invention en ajoutant au composant à base de fibrinogène et stabilisé avec de l'urée au moins un agent adhésif. Il peut ainsi s'agir de collagène, de glycérol ou encore d'un acide aminé. A titre d'acide aminé on peut en particulier citer la lysine, la glycine ou l'acide glutamique.

5 Les exemples donnés ci-après permettront de mettre en évidence d'autres avantages et caractéristiques de la présente invention, sans pour autant en limiter la portée.

10 PREPARATION DU COMPOSANT A BASE DE FIBRINOGENE

..... A partir de 280 l de plasma, la cryoprécipitation a permis de récupérer 2 kg de précipité (cryoprécipité). Les protéines entrant dans la composition de la colle sont obtenues après remise en solution de ce précipité (1 kg/4 litres) dans un tampon tris 20 mM pH 7, suivi d'une précipitation à la température de 25°C après addition d'héparine à 32 U/ml. La suspension ainsi obtenue est centrifugée, le culot (environ 1 kg) est récupéré puis remis en solution dans du citrate trisodique 70 mM - glycine 0,1 M - NaCl 0,03 M - acide aminocaproïque 50 mM - arginine 50 mM et aprotinine 100 U/ml à pH 8 (1 kg/1 litre). On procède alors à un chauffage liquide 10 heures à 60°C après avoir ajouté des stabilisants de protéines, à savoir 2400 g de glucose et 600 g de sorbitol à 2 litres de solution pour un volume final d'environ 4 litres (compte-tenu de la dilution due à l'addition des sucres). Après pasteurisation, la solution est diluée 10 fois dans du citrate 5 mM-NaCl 0,051 M - acide -aminocaproïque 25 mM - arginine 17 mM pH 7. La solution obtenue est alors précipitée à l'alcool à 10% final à une température comprise entre -2 et -3°C. Les protéines précipitées sont récupérées dans le culot de centrifugation. Celui-ci est ensuite remis en solution dans du citrate trisodique 1 mM - NaCl 60 mM - acide -aminocaproïque 20 mM - glycine 60 mM pH 7,5.

30 Les protéines sont ensuite concentrées jusqu'à un taux de 27 - 30 g/l pour un volume final de 1,5 l auquel on rajoute du polysorbate à 0.25%, et du caprylate de sodium à 0,15 g/l. Le produit est ensuite réparti en flacons après filtration stérilisante puis lyophilisé. La concentration en protéines

coagulables peut être modulée en fonction du volume de reconstitution du lyophilisat. Le produit obtenu présente, pour un taux de protéines de (85-150) g/l, (80-120) g/l de fibrinogène coagulable, (4-15) g/l de fibronectine et un taux d'aprotinine de 2 000 KIU/ml (solvant utilisé pour la reconstitution du lyophilisat).

EXEMPLE I

10 Trois solutions de fibrinogène à 110 g/l, obtenues selon le mode opératoire décrit précédemment, sont additionnées d'urée à différentes concentrations (U1, U2 et U3), et testées pour leur stabilité dans le temps à la température de 4°C. La stabilité est évaluée par la concentration de fibrinogène coagulable et par l'adhésivité de la colle après ajout de la thrombine calcique, après un mois.

15 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I ci-après. Ce tableau rend également compte à titre comparatif des résultats observés avec un témoin à base de fibrinogène, c'est-à-dire sans urée.

20 On constate que l'adhésivité des compositions varie de manière importante entre le témoin et la colle contenant 0,5 M d'urée.

25

30

TABLEAU I

	FIBRINOGENE COAGULABLE (g/l)			Adhésivité TO g/cm ²	Adhésivité 1 mois à 4°C g/cm ²
	1 sem 4°C	3 sem 4°C	5 sem 4°C		
Témoin	88	99	114,5	100	59,1
U1 (0,15M)	89,5	104,5	107,5	100	68,7
U2 (0,25M)	93,5	102,5	110,5	100	63
U3 (0,50M)	91,5	99	106	100	100,7

N.B. : Les échantillons Témoin, U1 et U2 ont été préalablement fluidifiés à 37°C pour les différentes analyses.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9100475
SA 48733

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/09/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0085923	17-08-83	DE-A-	3203775	11-08-83
		AU-B-	556068	23-10-86
		AU-A-	1110583	11-08-83
		CA-A-	1186995	14-05-85
		JP-A-	58135817	12-08-83
		US-A-	4650678	17-03-87

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00475

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB
Int.C1.5 A 61 L 25/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	A 61 L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	EP-A-0 085 923 (BEHRINGWERKE) 17 août 1983, voir page 2a, ligne 1; page 4a, lignes 1-7; page 5, lignes 20-28; page 7, lignes 4-6; revendications 1,7; page 3, lignes 16-22	1

• Catégories spéciales de documents cités¹¹

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31-07-1991

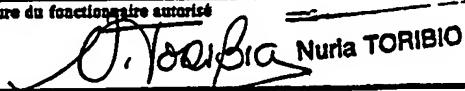
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20.09.91

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

 Nuria TORIBIO

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9100475
SA 48733

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11/09/91

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0085923	17-08-83	DE-A- 3203775 AU-B- 556068 AU-A- 1110583 CA-A- 1186995 JP-A- 58135817 US-A- 4650678	11-08-83 23-10-86 11-08-83 14-05-85 12-08-83 17-03-87

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00475

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. ⁵ A 61 L 25/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. ⁵	A 61 L

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP, A, 0085923 (BEHRINGWERKE) 17 August 1983, see page 2a, line 1; page 4a, lines 1-7; page 5, lines 20-28; page 7, lines 4-6; claims 1,7; page 3, lines 16-22	1

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

31 July 1991 (31.07.91)

Date of Mailing of this International Search Report

20 September 1991 (20.09.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

EXEMPLE II

Les quatre solutions à base de fibrinogène décrites dans l'exemple I ont en outre subi des tests complémentaires afin de déterminer leur pH, leur osmolarité, et d'apprécier leur durée de fluidification pour passer d'une température de 4°C à la température ambiante.

Les résultats figurent dans le tableau II.

10

		Etat à 4°C	Temps de rétablissement de la fluidité à 20°C	pH	Osmolarité mOsm/l
15	Témoin	Gélifié	Préchauffage à 37°C: non fluide	7,4	787
20	U1	Visqueux	30 min.	7,38	912
25	U2	Visqueux	15 min.	7,51	1020
	U3	Fluide	Fluide	7,48	184

30

TABLEAU II

EXEMPLE III

5 Cet essai a été réalisé en utilisant une solution de fibrinogène à 110 g/l, obtenue selon le mode opératoire décrit précédemment, hormis l'étape de concentration-dialyse qui a été réalisée par ultra-filtration sur cassette 100 K.

10 Une partie de la solution finale obtenue a été stockée après addition d'urée qsp 0,5 M, à deux ambiances correspondant respectivement aux températures de +4°C et de +25°C.

15 Cet essai montre que lorsque l'osmolarité est contenue dans des normes physiologiques du fait de la concentration par ultra-filtration, le produit reste fluide et stable en présence d'urée 0,5 M, après un mois de stockage à +4°C et à +25°C. On ne constate aucune altération des caractéristiques physico-chimiques et en particulier de l'adhésivité, par suite de l'abaissement d'osmolarité consécutif à la dialyse par ultra-filtration.

Les résultats sont présentés dans le tableau III ci-après.

20

25

30

TABLEAU III

	Témoin TO sans urée	Témoin TO + urée 0,5M	+ urée 0,5M 1 mois à 4°C	+ urée 0,5M 1 mois à 25°C
PROTEINES g/l	126	113	111	111,5
Fg COAG. g/l	100	105	96,5	93
FIBRONECTINE g/l	6,1	7,1	---	---
pH	7,6	7,5	7,5	7,4
OSMOLARITE mosmo/l	208	700	723	718
ADHESIVITE g/cm	139	140	145	141

REVENDICATIONS

1 - Colle biologique pour tissus humains ou animaux du type à deux composants, comportant :

5 - un premier composant à base de fibrinogène, et
- un second composant à base de thrombine
destinés à être mélangés extemporanément au moment de l'emploi, caractérisée en ce que le composant à base de fibrinogène contient au moins un agent chaînotropique, et en ce que la colle est liquide à basse température.

10 2 - Colle biologique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent chaînotropique est l'urée.

3 - Colle biologique selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'urée est présente dans le composant à base de fibrinogène, à une concentration comprise entre environ 0,3M et 1M.

15 4 - Colle biologique selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'urée est présente dans le composant à base de fibrinogène à une concentration proche de 0,5M.

5 - Colle biologique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le composant à base de fibrinogène a subi au préalable une inactivation virale.

20 6 - Colle biologique selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'osmolarité du composant à base de fibrinogène a été réduite avant l'addition de l'agent chaînotropique.

7 - Colle biologique selon la revendication 6, caractérisée en ce que la réduction de l'osmolarité a été réalisée en effectuant une dialyse par ultrafiltration du composant à base de fibrinogène.

25 8 - Colle biologique selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le composant à base de fibrinogène contient en outre au moins un composé favorisant l'adhésivité de la colle.

30 9 - Colle biologique selon la revendication 8, caractérisée en ce que le composé favorisant l'adhésivité peut être choisi parmi le collagène, le glycérol et un acide aminé, dont en particulier la lysine, la glycine et l'acide glutamique.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.